

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Mia Došen

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Mia Došen

MATEMATIČKI MODEL KASKADNE REAKCIJE

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

Članovi ispitne komisije: izv. prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević
dr. sc. Martina Sudar, zn. sur.
dr. sc. Dajana Kučić, zn. sur.

Zagreb, rujan 2016.

SAŽETAK

U ovom radu određivana je kinetika oksidoredukcije Cbz-*N*-3-aminopropanola u Cbz-*N*-3-aminopropanal katalizirana enzimom alkohol dehidrogenazom iz konjske jetre (HLADH). Ova reakcija je sastavni dio kaskadne reakcije koja se sastoji od opisane oksidacije alkohola u aldehid, potom aldolne adicije dihidroksiacetona (DHA) na pripadajući aldehid koja je katalizirana enzimom D-fruktoza-6-fosfat aldolazom (FSA) kako bi se dobio odgovarajući aldolni produkt, odnosno (3*S*,4*R*)-6-[(benziloksikarbonil)amino]-5,6-dideoksiheks-2-uloza. Ova kaskadna reakcija također uključuje i regeneraciju koenzima NAD⁺ uz NADH oksidazu (NOX) izoliranu iz *Lactococcus lactis*, te je kao takva uzeta u obzir pri ispitivanju kinetike.

Provedena su eksperimentalna ispitivanja enzimске aktivnosti u prethodno opisanoj reakciji oksidoredukcije, te su na temelju dobivenih podataka i procijenjeni kinetički parametri. Razvijen je matematički model kaskadne reakcije, te su provedene simulacije pomoću programskog paketa SCIENTIST kako bi se ispitao utjecaj pojedine komponente u reakciji na konačnu koncentraciju aldolnog produkta.

Ključne riječi: kaskadna reakcija, HLADH, DHA, FSA, NOX, enzimi, Michaelis-Menteničina kinetika

ABSTRACT

Kinetics of oxidoreduction of Cbz-*N*-3-aminopropanol to Cbz-*N*-3-aminopropanal catalyzed by horse liver alcohol dehydrogenase (HLADH) was studied in this work. This reaction is a constituent part of a cascade reaction composed of the described oxidation from alcohol to aldehyde, following with the aldol addition of dihydroxyacetone (DHA) to the corresponding aldehyde, catalyzed by D-fructose-6-phosphate aldolase (FSA) for the production of aldol product, (3*S*, 4*R*)-6-[(benzyloxycarbonyl)amino]-5,6-dideoxyhex-2-ulose. This cascade reaction also contains a coenzyme regeneration of NAD⁺ catalyzed by NADH oxidase (NOX) isolated from *Lactococcus lactis* and was taken into consideration in the study of kinetics.

Enzyme activity was studied in the previously described oxidoreduction reaction. The kinetic parameters were estimated from the data obtained in the conducted experiment. Mathematical model for the cascade reaction was developed and simulated by using the software package SCIENTIST. The influence of concentrations of different components of the reaction system to the final aldol product concentration was simulated.

Key words: cascade reaction, HLADH, DHA, FSA, NOX, enzymes, Michaelis-Menten kinetics, SCIENTIST

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. BOKATALIZATORI	2
2.1.1. Prednosti uporabe biokatalizatora u industriji	3
2.1.2. Enzim alkohol dehidrogenaza iz jetre konja	4
2.1.3. D-fruktoza-6-fosfaldolaza (FSA)	6
2.1.4. Regeneracija koenzima i NADH oksidaza	7
2.2. KASKADNE REAKCIJE	8
2.3. MODELIRANJE ENZIMSKIH REAKCIJA	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. APARATURA	13
3.2. ODREĐIVANJE KINETIKE REAKCIJE OKSIDOREDUKCIJE KATALIZIRANE HLADH	14
3.2.1. Ispitivanje utjecaja koncentracije alkohola i NAD^+ na specifičnu aktivnost enzima u reakciji oksidacije	14
3.2.2. Ispitivanje utjecaja koncentracije aldehida i NADH na specifičnu aktivnost enzima u reakciji oksidacije	15
3.2.3. Ispitivanje utjecaja koncentracije aldehida i NADH na specifičnu aktivnost u reakciji redukcije	16
3.2.4. Ispitivanje utjecaja koncentracije alkohola i NAD^+ na specifičnu aktivnost enzima u reakciji redukcije	17
4. MATEMATIČKI MODEL KASKADNE REAKCIJE	18
4.1. PROCJENA KINETIČKIH PARAMETARA	18
4.2. RAZVOJ MATEMATIČKOG MODELA KASKADNE REAKCIJE	18
5. REZULTATI I RASPRAVA	22
5.1. ODREĐIVANJE KINETIKE OKSIDOREDUKCIJE KATALIZIRANE ALKOHOL DEHIDROGENAZOM	22
5.1.1. Kinetika oksidacije alkohola	22
5.1.2. Kinetika redukcije aldehida	24
5.2. OPTIMIRANJE POČETNIH UVJETA REAKCIJE POMOĆU SIMULACIJA MATEMATIČKIM MODELOM KASKADNE REAKCIJE U KOTLASTOM REAKTORU	25
5.2.1. Utjecaj koncentracije alkohol dehidrogenaze na konačnu koncentraciju aldola	26
5.2.2. Utjecaj koncentracije FSA na konačnu koncentraciju aldola	27
5.2.3. Utjecaj koncentracije NOX na konačnu koncentraciju aldola	28
5.2.4. Utjecaj koncentracije DHA na konačnu koncentraciju aldola u reaktoru	29
5.2.5. Utjecaj koncentracije NAD^+ na konačnu koncentraciju aldola	30
6. ZAKLJUČAK	31
7. LITERATURA	32
PRILOG	35
POPIS SIMBOLA	36
ŽIVOTOPIS	37

1. UVOD

Tijekom posljednjih nekoliko godina, pojava koncepta "zelene kemije" otvorila je vrata novim mogućnostima zaštite ljudskog zdravlja i okoliša, posebice s ekonomskog aspekta. Napredak se očituje kroz razna područja, kao što je npr. korištenje sigurnijih i čistijih otapala, sigurnih za okoliš, te uporaba i razvitak obnovljivih sirovina. Ovakav održivi razvitak industrije zasigurno pruža veoma dobar utjecaj na okoliš, a daje i rješenja mnogim globalnim pitanjima s kojima se današnje čovječanstvo susreće (Anastas & Kirchoff, 2002).

Jedan, odavno poznat, no u zadnje vrijeme često korišten koncept, jesu kaskadne reakcije. Sinteza prirodnih produkata i biološki aktivnih spojeva, kao što su farmaceutici, dosegla je impresivno visoku razinu sofisticiranosti. Iako smo veoma daleko od bilo kakve "idealne sinteze" u kojoj bi se uz što manje utroška mogle proizvesti i više nego dovoljne količine traženog produkta, kaskadne reakcije su se pokazale efikasnim i visoko isplativim konceptom (Grondal et al., 2010). Reakcija koja bi se inače morala provesti u nekoliko zasebnih koraka, kaskadama se može izvesti u samo jednome – ovo je samo jedna od prednosti koju ovakva vrsta sinteze pruža (Nicoulau & Chen, 2009).

Biokatalizatori, odnosno enzimi također zauzimaju veoma važnu poziciju u razvitku novih tehnologija. Njihova ključna uloga u svim živim organizmima pokazatelj je njihove važnosti, te je kao takva prepoznata i otada korištena u sintezi širokog spektra raznih tvari. Osim izvanredne katalitičke sposobnosti, njihovom uporabom reducira se nastanak nepotrebnih nusprodukata, čime se i smanjuje negativan utjecaj na okoliš, te ih stoga možemo smatrati također dijelom "zelene kemije" (Saibi et al., 2012).

Modeliranje enzimskih reakcija, stoga predstavlja veoma važnu ulogu u reakcijskom inženjerstvu. Razvijanje matematičkih modela daje nam uvid u ponašanje pojedinih enzima u specifičnim reakcijama, te nam daje mogućnost predvidjeti ishod pojedine reakcije, štedeći pri tome vrijeme, rad i utrošene resurse (Baş & Boyacı, 2005).

2. OPĆI DIO

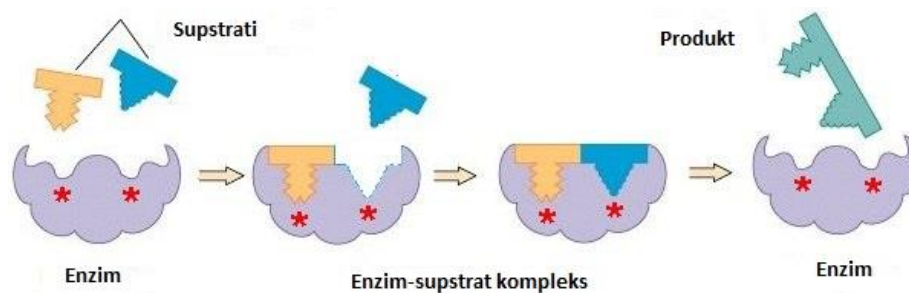
2.1. BIOKATALIZATORI

Enzimi, odnosno biološki katalizatori jesu proteini koji ubrzavaju određenu reakciju dovodeći ju do kemijske ravnoteže. Ono što zapravo razlikuje biokatalizatore od ostalih vrsta kemijskih katalizatora jest to što kataliziraju reakcije u živim organizmima, odakle potječe i njihov naziv. Enzimi snižavaju energiju aktivacije reakcije ubrzavajući biokemijske reakcije koje se odvijaju u stanici. Funkcionalnost stanice i njezina reproduktivnost zahtjeva potpunu sinergiju i koordinaciju svih reakcija uz potpunu kontrolu, te su tako biokatalizatori ključni sudionici za pravilno odvijanje procesa (Saibi et al. 2012). Općenito, možemo ih koristiti u dva osnovna oblika: kao pročišćene enzime i enzime u cijelim stanicama (živim ili neživim).

Enzime možemo definirati kao organske makromolekule, odnosno globularne proteine koji su organizirani u četiri strukturna nivoa. Primarna struktura sadržava aminokiseline povezane peptidnim vezama u peptidni lanac, dok se u sekundarnoj strukturi peptidni lanci međusobno savijaju u spiralu gdje dolazi do stvaranja vodikovih veza. U tercijarnoj strukturi peptidni lanci se preklapaju, a u kvartarnoj se spajaju u veće aglomerate, pri čemu dolazi do stvaranja disulfidnih veza (van't Riet & Tramper, 1991).

Enzimi rade po principu ključ-brava, hipotezi koju je 1894. razvio Emil Fischer. Princip katalize temelji se na analogiji samog oblika enzima i aktivnog mjesta na kojem se veže, što također povlači i samu činjenicu da su enzimi visoko specifični i tako sposobni katalizirati jednu ili mali broj reakcija. Enzim tvori kompleks sa supstratom u kojem pronalazimo van der Waalsovu, vodikovu, elektrostatsku ili čak kovalentnu vezu (veoma rijetko). Kompleksiranje i odvajanje stoga mora biti veoma brzo i reverzibilno tako da se produkt odvaja od enzima, te time oslobađa enzim koji može nastaviti svoje katalitičko djelovanje na ostale molekule (Suzuki, 2015).

Na slici 2.1. je prikazan mehanizam katalitičkog djelovanja enzima.



Slika 2.1. Mehanizam kataličkog djelovanja enzima

Prema IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology), enzimi se dijele na sljedeće skupine: (1) oksidoreduktaze, (2) hidrolaze, (3) transferaze, (4) liaze, (5) izomeraze i (6) ligaze. Svaka od ovih skupina nosi određena svojstva koju enzimi nose i uključuju određene procese koje su sposobni obavljati. U ovom radu fokus će biti na aldolazama (liaze), dehidrogenazama i oksidazama (obje pripadaju skupini oksidoreduktaza) te će detaljnije biti riječi o njima u poglavljima koji slijede.

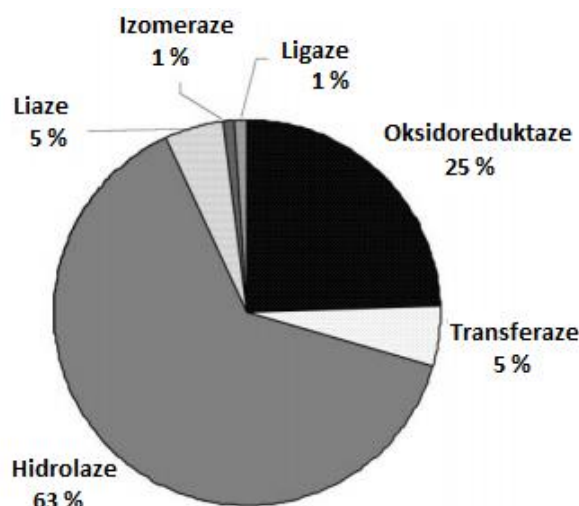
2.1.1. Prednosti uporabe biokatalizatora u industriji

Trend uporabe biokatalizatora u industriji raste iz godine u godinu, gdje se primjećuje kontinuirana integracija kroz različite procese i proizvodnje, poput proizvodnje akrilamida, fruktoze, jabučne i asparaginske kiseline, sve do sinteze visoko kompleksnih intermedijera i lijekova. Razvitak molekularne biologije, sam napredak u tehnologiji i uporabi novijih instrumenata, doveo je do principa usmjerene evolucije biokatalizatora, te njihovog inženjeringa kako bi se povećala i prilagodila njihova aktivnost i selektivnost (Zaks, 2001).

Najveća prednost koju biokatalizatori posjeduju nad kemijskim katalizatorima jest upravo u njihovoj visokoj selektivnosti. Razlikujemo tri glavna tipa selektivnosti, a to su: enantioselektivnost (enzim pritom prepoznaje svaki oblik kiralnosti i u skladu s njim stvara kompleks), kemoselektivnost (djelovanje samo na jedinstveni tip funkcionalne skupine) i regioselektivnost (razlikovanje funkcionalnih skupina koje su smještene na različitim područjima molekule supstrata). Ovakva selektivnost je vrlo poželjna u različitim kemijskim sintezama, jer može pružiti razne prednosti poput potpunog izbacivanja ili reduciranog korištenja zaštitnih skupina pri raznim organskim sintezama, izbjegavanje nepoželjnih reakcija čime je nastanak nusprodukata minimaliziran, te je također važno spomenuti i lakšu separaciju samih produkata i manji utjecaj na okoliš (Johannes et al., 2006).

Zanimljiv primjer biokatalizatora možemo pronaći u morskom svijetu. Naime, ekstremofili čije karakteristike preživljavanja u područjima ekstremno visokih ili niskih temperatura, visokim koncentracijama soli te visokim tlakovima, čine ih idealnim kandidatima za biokatalitičko djelovanje. Primjerice, mikroalge mogu imati ključnu ulogu u procesima biotransformacija, biosinteza i čak kao testni organizmi u ekotoksikologiji kako bi se mogla odrediti razina onečišćenja u specifičnom morskom području (Trincone, 2010).

Na slici 2.2 prikazan je udio pojedinih vrsta enzima koji se koriste u industriji.



Slika 2.2. Uporaba pojedinih vrsta enzima u industriji.

O uporabi enzima u industriji može govoriti isključivo iz aspekta isplativosti, o njihovoj selektivnosti, odnosno o reakciji koju želimo provesti, potom naravno o njihovoj cijeni i pristupačnosti. Iz dijagrama (slika 2.2.) je vidljivo kako se hidrolaze najviše koriste. Hidrolaze kataliziraju reakcije hidrolize i imaju najveću primjenu u industriji, a većina njih ni ne zahtjeva rad koenzima. Sljedeće po redu su oksidoreduktaze, enzimi koji kataliziraju oksido-redukcijske reakcije, koje su također veoma bitne i korisne u industriji. Kao primjer oksidoreduktaza u ovom radu koristiti će se alkohol dehidrogenaza iz jetre konja.

Kao i kemijski katalizatori i biokatalizatori imaju svoje mane, te su tako primjerice podložniji inhibiciji supstratom ili produktom. Nadalje, biokatalizatori su daleko osjetljiviji na više temperature i pH, a mogu i izazvati alergijske reakcije (Johannes et al., 2006).

2.1.2. Enzim alkohol dehidrogenaza iz jetre konja

Oksidoreduktaze, kao što smo već spomenuli, skupina je enzima koje kataliziraju oksido-redukcijske reakcije uz prijenos elektrona s jedne molekule na drugu odnosno, s reducensa na oksidans. Jedna od ključnih podvrsta ove vrste enzima jest dehidrogenaza koja

prenosi vodikov atom sa supstrata na koenzim (npr. NAD^+ ili NADP^+) koji djeluje kao akceptor.

Enzim alkohol dehidrogenaza (ADH) se može pronaći u pekarskom kvascu, pa tako i u ostalim živim bićima. On je ključna komponenta staničnog metabolizma, te ima sposobnost katalizirati oksido-redukciju primarnih i sekundarnih alkohola u pripadajuće aldehide i ketone (Oppenheimer & Henahan, 1995). Ovaj enzim je vrlo važan primjerice u analitičke svrhe pri određivanju koncentracije alkohola u krvi (Edenberg, 2007). Pošto ima sposobnost katalizirati oksidaciju alkohola u pripadajući aldehyd, posebice etanol, nije začuđujuća činjenica da se najveća koncentracija ovog enzima može pronaći upravo u jetri, dok je u drugim tkivima njihova koncentracija znatno manja (Crabb et al. 2004).



Slika 2.3. Struktura ADH (Eklund et al., 1974)

ADH je prvi put 1937. izoliran iz pekarskog kvasca, a 1948. iz konjske jetre. Daljnjim istraživanjem utvrđeno je da ADH, koji je prisutan u sisavcima i kvascu, nema jednaka svojstva. Naime, onaj koji je prisutan u kvascu je dvostruko veći u strukturi, i čak 100 puta aktivniji od onoga u sisavcima. 1955. utvrđena je prisutnost cinka u alkohol dehidrogenazi, a 1964. radom Å. Åkesona utvrđeno je da se četiri atoma cinka nalaze po jednoj molekuli HLADH, gdje je pretpostavljeno da dva atoma nose enzimatsku funkciju, dok preostala dva pomažu pri stabilizaciji same strukture proteina. Kasnije, 1966. utvrđeno je da se bez prisutnosti cinka zaista narušava kako njegova katalitička sposobnost tako i njegova struktura (Worthington, 1993).

Razlikujemo tri glavne skupine ADH: (1) NAD(P) ovisne dehidrogenaze, (2) NAD(P) – neovisne dehidrogenaze i (3) oksidaze koje mogu katalizirati ireverzibilnu oksidaciju alkohola (Reid, 1994). Specifična vrsta ADH koja je korištena u ovome radu može se pronaći u jetri konja vrste *Equus caballus* (HLADH). HLADH jest dimer ovisan o cinku i NAD-u,

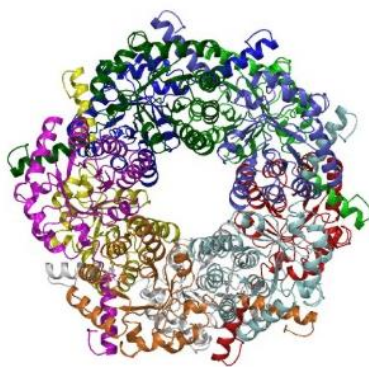
koji oksidira razne vrste primarnih, sekundarnih i cikličkih alkohola (Ramaswamy et al. 1994). Općenito, ova vrsta enzima pronalazi široku upotrebu u kemijskoj, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Posebice veliku primjenu ima u oksidaciji kiralnih alkohola, jer je njihova potražnja i primjena velika u industriji, a ipak na kraju i bitna kako bi se mogli dobiti relativno čisti kemijski agensi, kako u farmaceutici tako i npr. u poljoprivredi (Wang et al., 2012).

2.1.3. D-fruktoza-6-fosfat aldolaza (FSA)

D-fruktoza-6-fosfat (FSA) jest enzim aldolaza koju pronalazimo u *E. coli*, pripada u skupinu liaza – enzima koji kataliziraju reakcije ne-hidrolitičkog i ne-oksidativnog cijepanja kemijskih veza. Aldolaze imaju ključnu ulogu u reakcijama aldolne adicije, posebice u proizvodnji kompleksnih kiralnih polihidroksiliranih molekula (Garrahou et al., 2009).

Razlikujemo dvije klase enzima aldolaze: klasa I i klasa II. D-fruktoza-6-fosfat aldolaza pripada klasi I. Ova specifična vrsta ima lizinski ostatak koji ima kataličko djelovanje, te sposobnost da reagira sa supstratom donorom kako bih proizveo enaminski intermedijer. On potom "napada" supstrat akceptor pritom formirajući novu C-C vezu. Hidroliza imina, zatim, dovodi do proizvodnje aldolnog produkta. Ova reakcija dovodi do nove konfiguracije koja se sastoji od dva nova stereogena centra. Neke aldolaze čak pokazuju visoku kontrolu nad formiranjem ovakve C-C veze, što ultimativno dovodi do stvaranja aldolnih produkata s visokom selektivnošću (Bolt et al., 2008).

Sve veća primjena FSA u vidu enzimatske reakcije očituje se u njegovoj sposobnosti da reagira s ne-fosforiziranim spojevima dihidroksiacetona (DHA) koji djeluju u obliku donora umjesto dihidroksiacetona fosfata (DHAP), koji su često skupi i otežano se sintetiziraju. FSA, dakle, ima mogućnost stereoselektivno katalizirati aldolnu adiciju DHA, hidroksiacetona (HA) i hidroksibutana (HB) na veoma široki spektar aldehida (Concia et al., 2009).



Slika 2.4. Struktura FSA (Hernandez et al., 2015)

Ono što je također zanimljivo jest da ovaj enzim ima sposobnost katalizirati sintezu iminošećera, posebice D-fagomina. Ovaj šećer može se pronaći u biljkama u niskim koncentracijama, a poznat je kao inhibitor glikoprocenih enzima te na taj način smanjuje rizik od razvitka netolerancije na inzulin i rizik od debljine. Također, može se koristiti kao dijetalni dodatak prehrani (Sudar et al., 2015). U ovom radu ispitivat će se kaskadna reakcija proizvodnje aldolnog produkta koji je upravo prekursor D-fagominu, čime ove reakcija dobiva na još većoj važnosti.

2.1.4. Regeneracija koenzima i NADH oksidaza

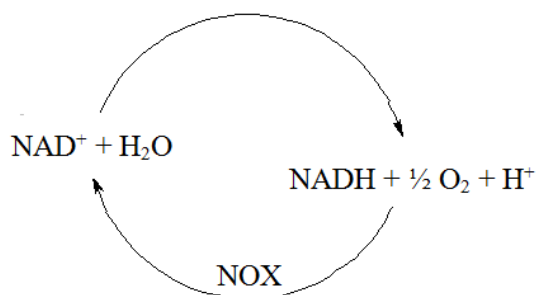
Veliki broj enzima jest ovisan o kofaktorima. Kofaktori su ne-proteinske molekule ili metalni ioni koji pomažu u biokemijskim transformacijama, primjerice pri prijenosu vodikovih elektrona ili funkcionalnih skupina u enzimski kataliziranim reakcijama. Neki od poznatih i često korištenih kofaktora jesu: ATP, FAD, koenzim A te nikotinamidi NAD^+ ili NADP^+ . Za razliku od ATP i FAD, ni NAD^+ , ni NADP^+ nisu kovalentno vezani za enzim. S obzirom na veoma visoku cijenu nikotinamidnih kofaktora kao što je NAD^+ , nije ih isplativo koristiti u stehiometrijskim omjerima. Stoga, veoma je bitno provesti odgovarajuću *in situ* regeneraciju ovih koenzima, ponajviše zbog ekonomskih razloga (Weckbecker et al., 2010).

Regeneracija koenzima NAD^+ predstavlja veliku važnost u oksidaciji alkohola u odgovarajuće aldehide. Osim ekonomskih razloga, regeneracijom se i pojednostavljuje izolacija dobivenog produkta, sprječava probleme koje može uzrokovati inhibicija produkta od strane kofaktora, te sama regeneracija može dovesti reakciju u termodinamički povoljnije stanje pomoću raznih usporednih reakcija (Sudar et al., 2014).

NADH oksidaza jest flavoprotein koji oksidira NADH u NAD^+ pomoću usporedne reakcije molekularnog kisika u vodikov peroksid prilikom četvero-elektronske redukcije

(NOX-2 enzimi) ili u vodu preko dvo-elektronske redukcije (NOX-1 enzimi). NADH oksidaza se može pronaći u raznim mikroorganizmima poput *Lactobacillus brevis*, *Streptococcus mutans*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus cereus*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Borelia burgdorferi*, *Streptococcus faecalis*, itd. (Sudar et al., 2014).

Na slici 2.5. jest shematski prikazan regeneracije NAD^+ pomoću NADH oksidaze.



Slika 2.5. Regeneracija NAD^+ pomoću NADH oksidaze (NOX)

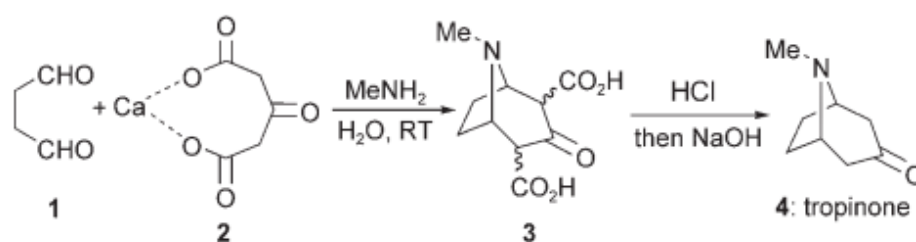
Možemo zaključiti da je usporedna reakcija nastanka vode preko dvo-elektronske redukcije pogodnija od nastanka vodikovog peroksida, zbog njegovog štetnog djelovanja što na enzime, što na glavnu reakciju. S obzirom na prethodno opisanu prednost ovakve reakcije, ovakav sustav regeneracije, u kojem kao nusprodukt nastaje voda, možemo smatrati "zelenim" i održivim (Sudar et al., 2014).

2.2. KASKADNE REAKCIJE

U posljednjih nekoliko godina koncept kaskadnih reakcija dobiva na sve većoj važnosti u području organske sinteze. Ova metodologija omogućava veću efikasnost te doprinosi samoj eleganciji reakcije. Osim navedenih prednosti, kaskadne reakcije imaju i pozitivan ekonomski i okolišni aspekt, koji je također poželjan kako u organskim tako i u većini kemijskih reakcija koje se odvijaju u industrijske svrhe (Nicolau & Chen, 2009).

Prva provedena kaskadna reakcija, zabilježena je 1917. radom Roberta Robinsona. On je naime, sintetizirao tropinon, alkaloid - sintetički prekursor atropina, koji se koristio u I. svjetskom ratu i tada bio u veoma oskudnim količinama. Ova reakcija stoji kao osnova svih

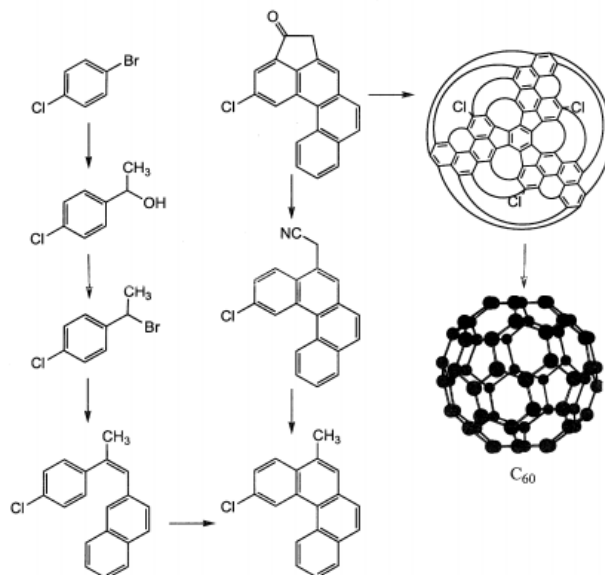
kaskada koje će se u budućnosti provesti i modelirati (Nicolau et al., 2006).



Slika 2.6. Robinsonova sinteza tropinona uporabom kaskade

Početni supstrat korišten u određenoj kaskadi dizajniran (ili je prirodno takav) da prilikom određene reakcije proizvede specifični produkt koji se ponaša kao supstrat za iduću reakciju, potom njegov produkt kao drugi supstrat i tako dalje, sve dok završni produkt ne dosegne svoju stabilnost pri određenim uvjetima reakcije. Izolacija reakcijskih intermedijera također nije potrebna, što nedvojbeno predstavlja samo jednu od prethodno opisanih prednosti kaskadnih reakcija (Nicolau & Chen, 2009).

Jedan od zanimljivih primjera uporabe kaskada jest sinteza C_{60} , tzv. Buckminsterfullerena. Ova alotropska modifikacija ugljika prvi put je otkrivena 1985., može se u veoma malim količinama pronaći u prirodi, no njegova najveća prisutnost jest u svemiru u čvrstom i plinovitom stanju. Na slici 2.8. prikazana je kaskadna reakcija sinteze C_{60} .



Slika 2.7. Shema kaskadne reakcija sinteze C_{60} (Buckminsterfullerena) (Narahari Sastry, 2003)

Naime, molekularni policiklički aromatični prekursor koji sadrži klor kao supstituente na određenim pozicijama sintetizira C_{60} uporabom FVP (Flash Vacuum Pyrolysis) metode,

prilikom čega dolazi do kaskade dehidrogenizacije cikličke strukture kako bih se ultimativno dobila struktura Buckminsterfullerena (Scott et al., 2002).

Kaskadne reakcije mogu se smatrati "zelenom kemijom". Reakcija koja bi se inače provela u više uzastopnih stupnjeva, primjenom koncepta kaskadnih reakcija moguće je provesti samo jednim korakom, što ju čini daleko efikasnijom po pitanju utrošenog vremena, rada, upotrebe resursa a i otpada, čija se proizvodnja dovodi na minimalnu razinu. Primjerice, upotreba samo jednog otapala, postupka obrade i pročišćavanja u samo jednom koraku, dostatno je za proizvodnju produkta koji bi inače zahtijevao više zasebnih uzastopnih reakcija (Nicolau et al., 2006).

2.3. MODELIRANJE ENZIMSKIH REAKCIJA

Kako bismo razumjeli kinetiku koje se krije iza enzimskih reakcija veoma je bitno proučiti samo ponašanje enzima te predvidjeti kako će određeni enzim reagirati u nekoj specifičnoj reakciji, pri različitim radnim uvjetima. U tu svrhu, razvijaju se matematički modeli. Matematički modeli su osnova reakcijskog inženjerstva i pružaju nam uvid u odvijanje specifične reakcije. Optimizacija je samo jedna od prednosti korištenja ovakve metode, a ona je osobito bitna jer nam omogućava optimiranje uvjeta kako bismo dobili što veće iskorištenje, bez većeg ulaganja u samu reakciju (Baş & Boyacı, 2005). Ova metoda posebice je važna primjerice u farmaceutskoj industriji, kliničkim dijagnozama, razvijanju lijekova te u samoj kemijskoj industriji općenito.

Kinetički model enzimske reakcije se određuje na osnovi eksperimentalnih istraživanja i daje vezu između brzine reakcije i veličina stanja, odnosno parametara prisutnih u specifičnoj reakciji. Razvijanje enzimskog kinetičkog modela odvija se kroz sljedeće korake: eksperimentalno određivanje početne brzine reakcije pri različitim koncentracijama supstrata, potom slijedi matematička obrada rezultata koji su dobiveni određenim eksperimentom te formuliranje izraza za brzinu reakcije, procjenjuju se kinetički parametri i određuje se ukupna brzina reakcije, a zatim se eksperimentalno potvrđuje predviđanje modela. Potom se traži veza između koncentracije reaktanata i brzine reakcije uz pomoć same konfiguracije reaktora i na kraju se na temelju razvijenog modela predviđaju optimalni procesni uvjeti za specifičnu reakciju (Murphy et al., 2002).

Pošto je veoma bitno razumjeti korelaciju između brzine reakcije i koncentracije supstrata, razvijeni su mnogi kinetički modeli upravo u tu svrhu. Jedan od najpoznatijih i najviše korištenih jest Michaelis-Menteničin kinetički model karakterističan za enzimske reakcije.

Michaelis-Menteničin kinetički model razvijen je od strane njemačkog biokemičara Leonor Michaelisa i kanadske fizičarke Maud Menten. Ovaj model daje korelaciju između brzine enzimske reakcije i koncentracije supstrata te se može opisati sljedećim izrazom (jed. 2.1.):

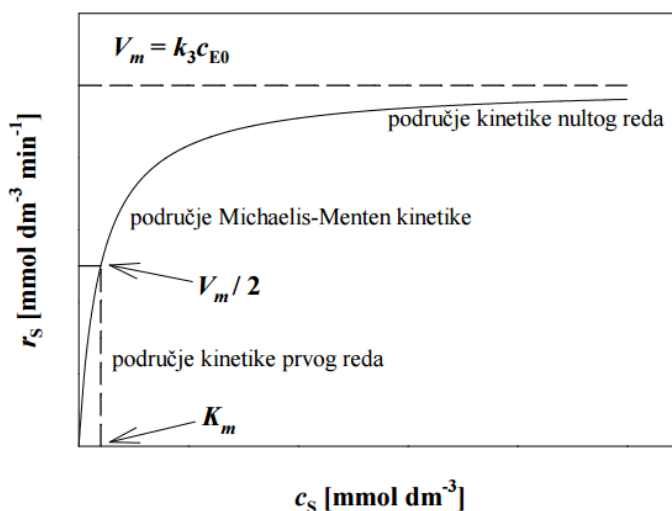
$$r_s = V_m \cdot \frac{c_s}{K_m^s + c_s} \quad (2.1.)$$

gdje r_s predstavlja brzinu reakcije ($\text{mmol/dm}^3\text{min}$), V_m maksimalnu brzinu reakcije ($\text{mmol/dm}^3\text{min}$), c_s koncentraciju supstrata (mmol/dm^3) i K_m^s koja predstavlja Michaelis-Menteničinu konstantu (mmol/dm^3). Parametar V_m pokazuje ovisnost o koncentraciji enzima i ta ovisnost je dana sljedećim izrazom (jed. 2.2.):

$$V_m = k_3 \cdot c_{E0} \quad (2.2.)$$

gdje je k_3 katalitička konstanta enzima (min^{-1}), c_{E0} početna koncentracija enzima (mmol/dm^3).

Na slici 2.6. jest prikazan dijagram ovisnosti brzine enzimske reakcije o koncentraciji supstrata koja je dana Michaelis-Menteničinim kinetičkim modelom predstavljena hiperbolnom krivuljom.



Slika 2.6. Ovisnost reakcijske brzine o koncentraciji supstrata kod Michaelis-Menteničine kinetike

Iz dijagrama je vidljivo kako Michaelis-Menteničina jednadžba opisuje tri područja brzine reakcije. Područje kinetike prvog reda opisuje linearnu ovisnost reakcijske brzine r_s o koncentraciji supstrata c_s pri niskim koncentracijama te se upravo iz tog razloga može tako i aproksimirati ($c_s \ll K_m^s$). S druge strane područje viših koncentracija aproksimira se kinetikom nultog reda ($c_s \gg K_m^s$). Također, iz dijagrama je također vidljivo da je Michaelis-

Menteničina konstanta K_m^s jednaka koncentraciji supstrata koja je potrebna da bi se postigla polovica maksimalne brzine. Iz toga, dakle, možemo zaključiti da što enzim jače veže svoj supstrat to je upravo manja vrijednost Michaelis-Menteničine konstante.

Osim jednosupstratne Michaelis-Menteničine kinetike, moguće je definirati i dvosupstratnu, koja zapravo čini i većinu svih enzimskih reakcija. Ona se opisuje sljedećim izrazom (jed. 2.3.):

$$r_{s1} = \frac{V_m \cdot c_{s1} \cdot c_{s2}}{(K_m^{s1} + c_{s1}) \cdot (K_m^{s2} + c_{s2})} \quad (2.3.)$$

gdje c_{s1} i c_{s2} predstavljaju koncentracije supstrata, a K_m^{s1} i K_m^{s2} predstavljaju Michaelis-Menteničine konstante za pojedine supstrate, pri čemu je važno napomenuti da je K_m^{s1} neovisna o c_{s2} , a K_m^{s2} neovisna o c_{s1} .

Inhibicija kemijske reakcije također čini važan faktor pri određivanju kinetike. Inhibitore neke reakcije možemo definirati kao ireverzibilne ili reverzibilne. Ireverzibilni inhibitori uzrokuju takovu nepovratnu inhibiciju pri čemu dolazi do potpunog gubitka enzimске aktivnosti nakon određenog vremena. Ovakva inhibicija je u potpunosti nepovratna i nemože se povratiti nikakvim fizikalnim putem, dok s druge strane kod reverzibilne inhibicije, uzrokovane reverzibilnim inhibitorima, moguć je povrat enzimске aktivnosti jednostavnim uklanjanjem inhibitora (Suzuki, 2015).

S obzirom na reverzibilni inhibitor razlikujemo tri posebne vrste inhibicije: kompetitivnu (jed. 2.4.), nekompetitivnu (jed. 2.5.) i antikompetitivnu inhibiciju (jed. 2.6.). Pri kompetitivnoj inhibiciji, inhibitor se veže na aktivno mjesto enzima i tako konkurira supstratu pri vezanju na slobodni enzim, kod nekompetitivne inhibicije on se ireverzibilno veže na aktivno mjesto enzima ili čak na neko drugo mjesto pritom mijenjajući oblik samog enzima onemogućavajući vezanje supstrata na aktivno mjesto (Geueke & Hummel, 2002)

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m^s \cdot \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right) + c_s} \quad (2.4.)$$

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m^s + c_s \cdot \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right)} \quad (2.5.)$$

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{\left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right) \cdot (K_m^s + c_s)} \quad (2.6.)$$

Koncentracija inhibitora dana je sa c_i (može biti produkt ili supstrat), a konstanta inhibicije dana je s K_i .

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. APARATURA

Mjerenje aktivnosti enzima alkohol dehidrogenaze iz jetre konja (HLADH) provedeno je uporabom dvozračnog spektrofotometra SHIMADZU UV-1601 (Japan) (Slika 3.1), dok je priprema pojedinih komponenata potrebnih za eksperimentalno ispitivanje provedena uporabom vage SHIMADZU AUW120 (Japan) (Slika 3.2.).



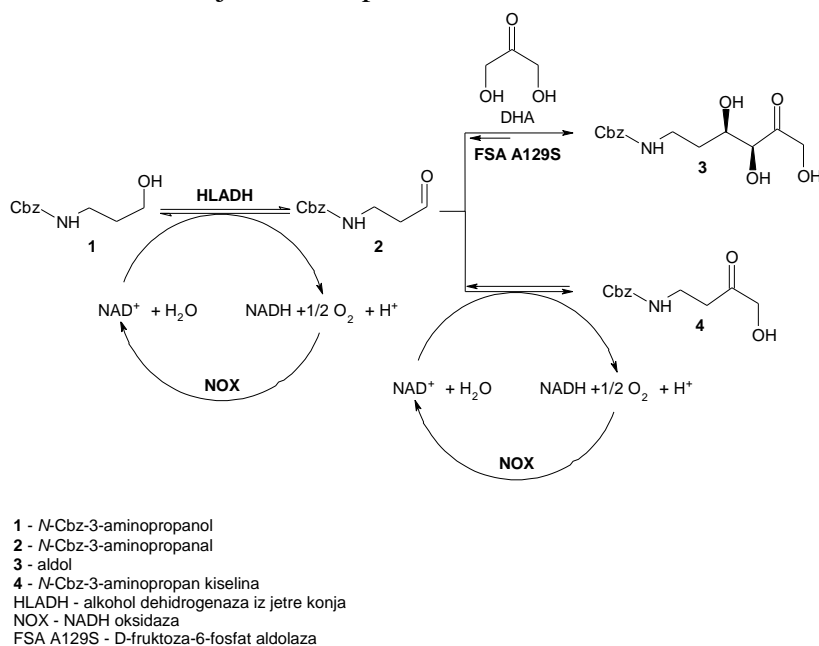
Slika 3.1. Spektrofotometar



Slika 3.2. Vaga

3.2. ODREĐIVANJE KINETIKE REAKCIJE OKSIDOREDUKCIJE KATALIZIRANE HLADH

Kaskadna reakcija se može prikazati slikom 3.3.



Slika 3.3. Shema kaskadne reakcije katalizirane enzimom HLADH

U ovom je radu određivana kinetika oksidoredukcije Cbz-*N*-3-aminopropanola katalizirane enzimom alkohol dehidrogenazom. Ova je reakcija dio kaskadne reakcije prikazane na slici 3.3. iz koje je vidljivo kako prvo dolazi do oksidacije Cbz-*N*-3-aminopropanola u pripadajući aldehid odnosno, Cbz-*N*-3-aminopropanal. Potom se odvija aldolna adicija DHA na Cbz-*N*-3-aminopropanal uz enzim D-fruktoza-6-fosfat aldolazu u odgovarajući aldolni produkt. Za vrijeme oksidacije alkohola odvija se regeneracija koenzima katalizirana NADH oksidazom (NOX). U nastavku slijedi opis eksperimenata prilikom određivanja kinetike oksidoredukcije Cbz-*N*-3-aminopropanola katalizirane enzimom alkohol dehidrogenazom.

3.2.1. Ispitivanje utjecaja koncentracije alkohola i NAD⁺ na specifičnu aktivnost enzima u reakciji oksidacije

Prilikom određivanja kinetike oksidoredukcije korištena je metoda početnih reakcijskih brzina. Pri tome je bilo potrebno odrediti utjecaj koncentracija supstrata i produkata na početnu brzinu reakcije. Mjerenja su provedena na način da je koncentracija jednog reaktanta bila konstantna u svim mjerenjima, dok se koncentracija drugog varirala od neke minimalne do maksimalne vrijednosti. U tablicama 3.1 i 3.2. se nalazi sastav otopine u

kiveti prilikom ispitivanja utjecaja koncentracije alkohola i NAD^+ u reakciji oksidacije alkohola.

Tablica 3.1. Sastav otopine u kiveti prilikom ispitivanja utjecaja koncentracije alkohola na aktivnost enzima

Komponenta	V [μL]	$c_{\text{temeljne otopine}} [\text{mmol/dm}^3]$
TEA HCl pufer (pH 8.0)	730,00	50,00
ACN	100-X	
alkohol	X	929,74
NAD^+	150,00	8,22
HLADH	20,00	5 mg/mL

Tablica 3.2. Sastav otopine u kiveti prilikom ispitivanja utjecaja koncentracije NAD^+ na aktivnost enzima

Komponenta	V [μL]	$c_{\text{temeljne otopine}} [\text{mmol/dm}^3]$
TEA HCl pufer (pH 8.0)	880-X	50,00
ACN	50,00	
alkohol	50,00	929,74
NAD^+	X	54,78
HLADH	20,00	5 mg/mL

3.2.2. Ispitivanje utjecaja koncentracije aldehida i NADH na specifičnu aktivnost enzima u reakciji oksidacije

Prilikom ispitivanja inhibicije produktima, koncentracije reaktanta (alkohol i NAD^+) su bile konstantne, dok je koncentracija produkata varirana od minimalne do maksimalne. U tablicama 3.3. i 3.4. nalazi se sastav otopine u kiveti prilikom ispitivanja inhibicije aldehidom i NADH u reakciji oksidacije alkohola.

Tablica 3.3. Sastav otopine u kiveti prilikom ispitivanja utjecaja koncentracije aldehida na aktivnost enzima

Komponenta	V [μL]	$c_{\text{temeljne otopine}} [\text{mmol/dm}^3]$
TEA HCl pufer (pH 8.0)	780,00	50,00
ACN	50 - X	
alkohol	50,00	36,00
NAD^+	100,00	60,00
Aldehid	X	50,00
HLADH	20,00	5 mg/mL

Tablica 3.4. Sastav otopine u kiveti prilikom ispitivanja utjecaja koncentracije NADH na aktivnost enzima

Komponenta	V [μ L]	$c_{\text{temeljne otopine}}$ [mmol/dm^3]
TEA HCl pufer (pH 8.0)	780 - X	50,00
ACN	50,00	
alkohol	50,00	36,00
NAD ⁺	100,00	60,00
NADH	X	1,00
HLADH	20,00	5 mg/mL

3.2.3. Ispitivanje utjecaja koncentracije aldehida i NADH na specifičnu aktivnost u reakciji redukcije

Prilikom ispitivanja utjecaja koncentracije aldehida i NADH u reakciji redukcije aldehida, koncentracija jednog reaktanta je bila konstantna, a koncentracija drugog je varirana od neke minimalne do maksimalne vrijednosti. U tablicama 3.5. i 3.6. nalazi se sastav otopine u kiveti prilikom ispitivanja inhibicije aldehydom i NADH u reakciji redukcije aldehida.

Tablica 3.5. Sastav otopine u kiveti prilikom ispitivanja utjecaja koncentracije aldehida na aktivnost enzima

Komponenta	V [μ L]	$c_{\text{temeljne otopine}}$ [mmol/dm^3]
TEA HCl pufer (pH 8.0)	940-X-Y	50,00
ACN	Y	
aldehyd	X	50,00
NADH	50,00	1,00
HLADH	20,00	5 mg/mL

Tablica 3.6. Sastav otopine u kiveti prilikom ispitivanja utjecaja koncentracije NADH na aktivnost enzima

Komponenta	V [μ L]	$c_{\text{temeljne otopine}}$ [mmol/dm^3]
TEA HCl pufer (pH 8.0)	720 - X	50,00
ACN	60,00	
aldehyd	200,00	50,00
NADH	X	1,00
HLADH	20,00	5 mg/mL

3.2.4. Ispitivanje utjecaja koncentracije alkohola i NAD^+ na specifičnu aktivnost enzima u reakciji redukcije

Prilikom ispitivanja utjecaja koncentracije alkohola i NAD^+ na aktivnost enzima u reakciji redukcije aldehida, koncentracije reaktanata, u ovom slučaju aldehida i NADH, su bile konstante, a koncentracija inhibitora je varirana u određenom rasponu koncentracija. U tablicama 3.7. i 3.8. nalazi se sastav otopine u kiveti prilikom ispitivanja inhibicije alkoholom i NAD^+ u reakciji redukcije aldehida.

Tablica 3.7. Sastav otopine u kiveti prilikom ispitivanja utjecaja koncentracije alkohola na aktivnost enzima

Komponenta	V[μL]	$c_{\text{temeljne otopine}}[\text{mmol/dm}^3]$
TEA HCl pufer (pH 8.0)	650,00	50,00
ACN	80- X	
aldehid	200,00	50,00
NADH	50,00	0,98
alkohol	X	527,66
HLADH	20,00	5 mg/mL

Tablica 3.8. Sastav otopine u kiveti prilikom ispitivanja utjecaja koncentracije NAD^+ na aktivnost enzima

Komponenta	V [μL]	$c_{\text{temeljne otopine}} [\text{mmol/dm}^3]$
TEA HCl pufer (pH 8.0)	650-X	50,00
ACN	80,00	
aldehid	200,00	50,00
NADH	50,00	0,98
NAD^+	X	60,00
HLADH	20,00	5 mg/mL

4. MATEMATIČKI MODEL KASKADNE REAKCIJE

4.1. PROCJENA KINETIČKIH PARAMETARA

Na temelju izmjerene enzimске aktivnosti alkohol dehidrogenaze (HLADH) procijenjeni su kinetički parametri karakteristični za reakciju oksidacije alkohola i redukcije aldehida. Praćenjem eksperimentalnih podataka, utvrđena je Michaelis-Menteničina kinetika, te je na temelju kinetičkog modela procijenjena maksimalna brzina reakcije oksidacije alkohola V_m^{ox} i Michaelisove konstante za alkohol i NAD^+ , odnosno $K_m^{alkohol}$ i $K_m^{NAD^+}$. Također, procijenjene su i konstante inhibicije za NADH i aldehyd, K_i^{NADH} i $K_i^{aldehyd}$. Utjecaji pojedinih komponenata na aktivnost enzima prilikom oksidacije alkohola prikazani su slikom 5.1. Ispitivanjem kinetike redukcije aldehida, procijenjeni su kinetički parametri, odnosno maksimalna brzina redukcije aldehida V_m^{red} , Michaelisove konstante za aldehyd i NADH, $K_m^{aldehyd}$ i K_m^{NADH} , te konstante inhibicije za NAD^+ i alkohol, $K_i^{NAD^+}$ i $K_i^{alkohol}$. Utjecaji pojedinih komponenata na aktivnost enzima prilikom reakcije redukcije aldehida prikazani su na slici 5.2. Vrijednosti navedenih Michaelisovih konstanti i maksimalne brzine reakcije procijenjene su nelinearnom regresijom koristeći simpleks metodu i metodu najmanjih kvadrata u programskom paketu Scientist. Vrijednosti procijenjenih kinetički parametara nalaze se u tablici 5.1.

4.2. RAZVOJ MATEMATIČKOG MODELA KASKADNE REAKCIJE

Na temelju raspoloživih literaturnih podataka, sheme reakcije (slika 3.2.) i eksperimentalnih podataka postavljen je matematički model oksidacije Cbz-*N*-3-aminopropanola u Cbz-*N*-3-aminopropanal uz regeneraciju koenzima kataliziranu NADH oksidazom (NOX). Matematički model nalazi se u prilogu 1. Kinetički parametri, kao i model za aldolnu adiciju dihidroksiacetona (DHA) na dobiveni Cbz-*N*-3-aminopropanal u konačni aldolni produkt su poznati od ranije. Reakcija oksidacije Cbz-*N*-3-aminopropanola u Cbz-*N*-3-aminopropanal katalizirana je enzimom alkohol dehidrogenazom iz jetre konja (HLADH). Brzina ove reakcije se može opisati dvosupstratnim Michaelis – Mentiničinim kinetičkim modelom uz kompetitivnu inhibiciju s NADH (jed. 4.1). Radi jednostavnosti, Cbz-*N*-3-aminopropanol će se referirati kao alkohol, a Cbz-*N*-3-aminopropanal kao aldehyd.

$$r_1 = \frac{V_m^{\text{ox}} \cdot c_{\text{alkohol}} \cdot c_{\text{NAD}} \cdot \gamma_{\text{ADH}}}{(K_m^{\text{alkohol}} + c_{\text{alkohol}}) \cdot \left[K_m^{\text{NAD}^+} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{NADH}}}{K_i^{\text{NADH}}} \right) + c_{\text{NAD}^+} \right]} \quad (4.1)$$

Brzina reakcije redukcije Cbz-*N*-3-aminopropanala se može opisati dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom uz inhibiciju s alkoholom i NAD^+ (jed. 4.2).

$$r_2 = \frac{V_m^{\text{red}} \cdot c_{\text{aldehid}} \cdot c_{\text{NADH}} \cdot \gamma_{\text{ADH}}}{\left[K_m^{\text{aldehid}} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{alkohol}}}{K_i^{\text{alkohol}}} \right) + c_{\text{aldehid}} \right] \cdot \left[K_m^{\text{NADH}} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{NAD}^+}}{K_i^{\text{NAD}^+}} \right) + c_{\text{NADH}} \right]} \quad (4.2)$$

Kinetika reakcije oksidoredukcije je određivana eksperimentalno u ovom radu, dok su preostali kinetički modeli, kao i kinetički parametri preuzeti iz ranijih mjerenja (Sudar et al., 2013; Sudar et al., 2014; Sudar et al., 2015).

Brzina reakcije aldolne adicije DHA na Cbz-*N*-3-aminopropanal katalizirana D-fruktoza-6-fosfat aldolazom (FSA) također se može opisati dvosupstratnom Michaelis – Menteničinom kinetikom (jed. 4.3).

$$r_3 = \frac{V_{m1} \cdot c_{\text{aldehid}} \cdot c_{\text{DHA}} \cdot \gamma_{\text{FSA}}}{(K_m^{\text{aldehid}} + c_{\text{aldehid}}) \cdot (K_m^{\text{DHA}} + c_{\text{DHA}})} \quad (4.3)$$

Brzina povratne retro-aldolne reakcije može se opisati Michaelis – Mentiničinom kinetikom s kompetitivnom inhibicijom s aldehidom (jed. 4.4).

$$r_4 = \frac{V_{m2} \cdot c_{\text{aldol}} \cdot \gamma_{\text{FSA}}}{\left[K_m^{\text{aldol}} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{aldehid}}}{K_i^{\text{aldehid}}} \right) + c_{\text{aldol}} \right]} \quad (4.4)$$

Regeneracija koenzima katalizirana NADH oksidazom (NOX) može se opisati dvosupstratnom Michaelis-Mentiničinom kinetikom uz antikompetitivnu inhibiciju s NAD^+ (jed. 4.5).

$$r_5 = \frac{V_{m3} \cdot c_{\text{NADH}} \cdot c_{\text{O}_2} \cdot \gamma_{\text{NOX}}}{\left(K_m^{\text{NADH}} + c_{\text{NADH}} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{NAD}^+}}{K_i^{\text{NAD}^+}} \right) \right) \cdot (K_m^{\text{O}_2} + c_{\text{O}_2})} \quad (4.5)$$

S obzirom da je Michaelisova konstanta za kisik ($K_m^{\text{O}_2}$) veoma malena vrijednost u odnosu na samu topljivost kisika u otopini, bilo je moguće zanemariti kisik kao supstrat, pa se brzina reakcije regeneracije može opisati pojednostavljenom jednosupstratnom Michaelis-Mentiničinom kinetikom uz antikompetitivnu inhibiciju s NAD^+ (jed. 4.6).

$$r_5 = \frac{V_{m3} \cdot c_{\text{NADH}} \cdot \gamma_{\text{NOX}}}{K_m^{\text{NADH}} + c_{\text{NADH}} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{NAD}^+}}{K_i^{\text{NAD}^+}}\right)} \quad (4.6.)$$

Kinetički parametri karakteristični za aldolnu adiciju DHA na Cbz-*N*-3-aminopropanal kataliziranu enzimom FSA A129S poznati su iz prijašnjih radova (Sudar et al. 2013).

Tablica 4.1. Kinetički parametri karakteristični za aldolnu adiciju DHA uz FSA A129S (Sudar et al. 2013).

Parametar	Jedinica	Vrijednost
V_{m1}	U/mg	10.20 ± 0.20
K_m^{DHA}	mmol/dm ³	11.01 ± 1.72
K_m^{aldehid}	mmol/dm ³	167.34 ± 22.30
V_{m2}	U/mg	203.03 ± 44.40
K_m^{aldol}	mmol/dm ³	1878.09 ± 548.53
K_i^{aldehid}	mmol/dm ³	0.24 ± 0.002

Također, poznati su i kinetički parametri karakteristični za oksidaciju NADH kataliziranu NADH oksidazom (NOX) uporabom TEA-HCl pufera, pH 8.0 (Sudar et al. 2014).

Tablica 4.2. Kinetički parametri oksidacije NADH kataliziranu NOX (Sudar et al. 2014).

Parametar	Jedinica	Vrijednost
V_{m3}	U/mg	16.409 ± 0.717
$K_i^{\text{NAD}^+}$	mmol/dm ³	0.142 ± 0.045
K_m^{NADH}	mmol/dm ³	0.005 ± 0.001

$$\frac{dc_{\text{NAD}^+}}{dt} = -r_1 + r_2 + r_5 \quad (4.7.)$$

$$\frac{dc_{\text{DHA}}}{dt} = -r_3 + r_4 \quad (4.8.)$$

$$\frac{dc_{\text{aldol}}}{dt} = r_3 - r_4 \quad (4.9.)$$

$$\frac{dc_{\text{NADH}}}{dt} = r_1 - r_2 - r_5 \quad (4.10)$$

$$\frac{dc_{\text{alkohol}}}{dt} = -r_1 + r_2 \quad (4.11.)$$

$$\frac{dc_{\text{aldehid}}}{dt} = r_1 - r_2 - r_3 + r_4 \quad (4.12.)$$

Jednadžbe 4.7 – 4.12. predstavljaju bilance tvari u kotlastom reaktoru za sve komponente u reakcijskom sustavu.

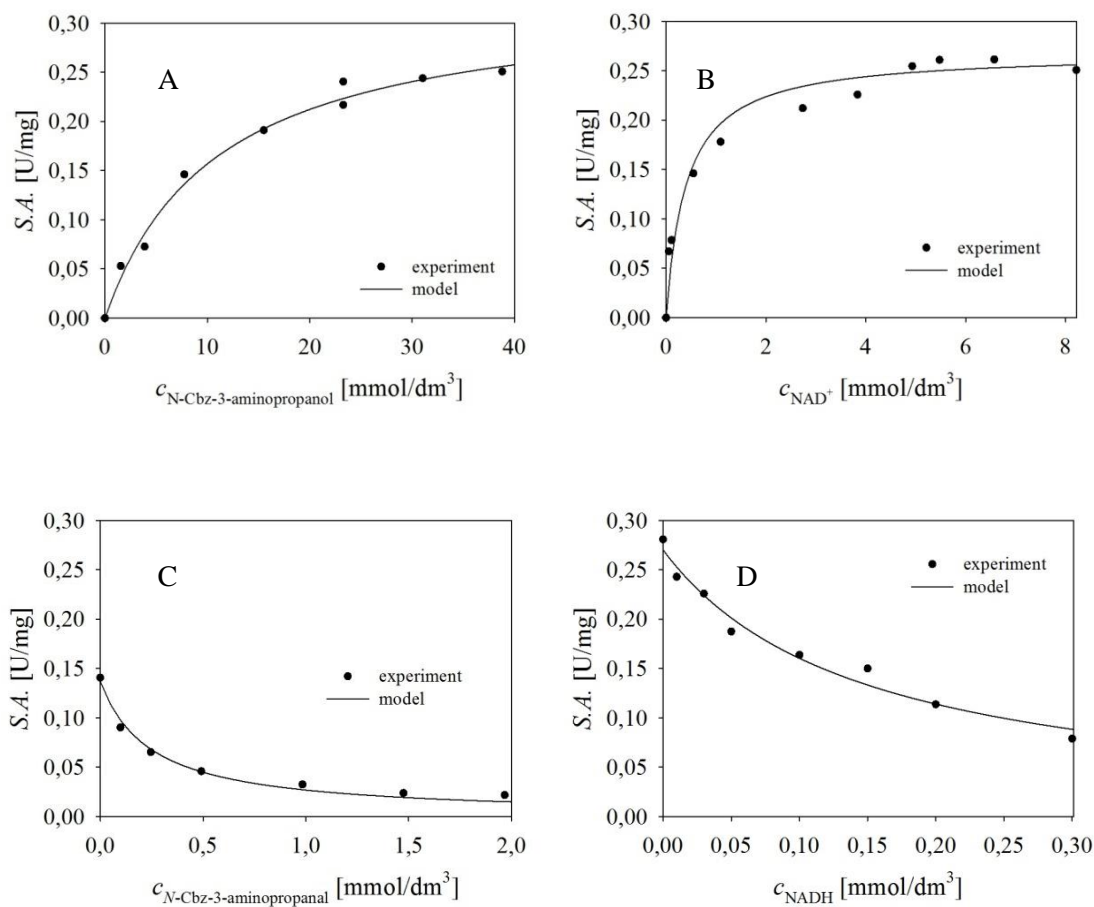
5. REZULTATI I RASPRAVA

Kako je cilj rada bilo optimiranje početnih uvjeta kaskadne reakcije pomoću matematičkog modela, provedena su eksperimentalna istraživanja kinetike oksidoredukcije Cbz-*N*-3-aminopropanola uz enzim alkohol dehidrogenazu. Ostale reakcije u kaskadi (regeneracija koenzima uz NADH oksidazu i aldolna adicija uz aldolazu) su ranije proučavane (Sudar et al., 2014, Sudar et al., 2013), te je kinetika reakcije bila poznata. Rezultati su u ovom radu podijeljeni u dva dijela: prvi koji se odnosi na eksperimentalna istraživanja i procjenu kinetičkih parametara u reakciji oksidacije Cbz-*N*-3-aminopropanola i redukciji Cbz-*N*-3-aminopropanala, te drugi dio koji se odnosi na provedene simulacije pomoću razvijenog matematičkog modela kaskadne reakcije. Rezultati određivanja kinetike su prikazani na slikama 5.1. i 5.2., dok su rezultati simulacija prikazani na slikama 5.3., 5.4., 5.5., 5.6. i 5.7.

5.1. ODREĐIVANJE KINETIKE OKSIDOREDUKCIJE KATALIZIRANE ALKOHOL DEHIDROGENAZOM

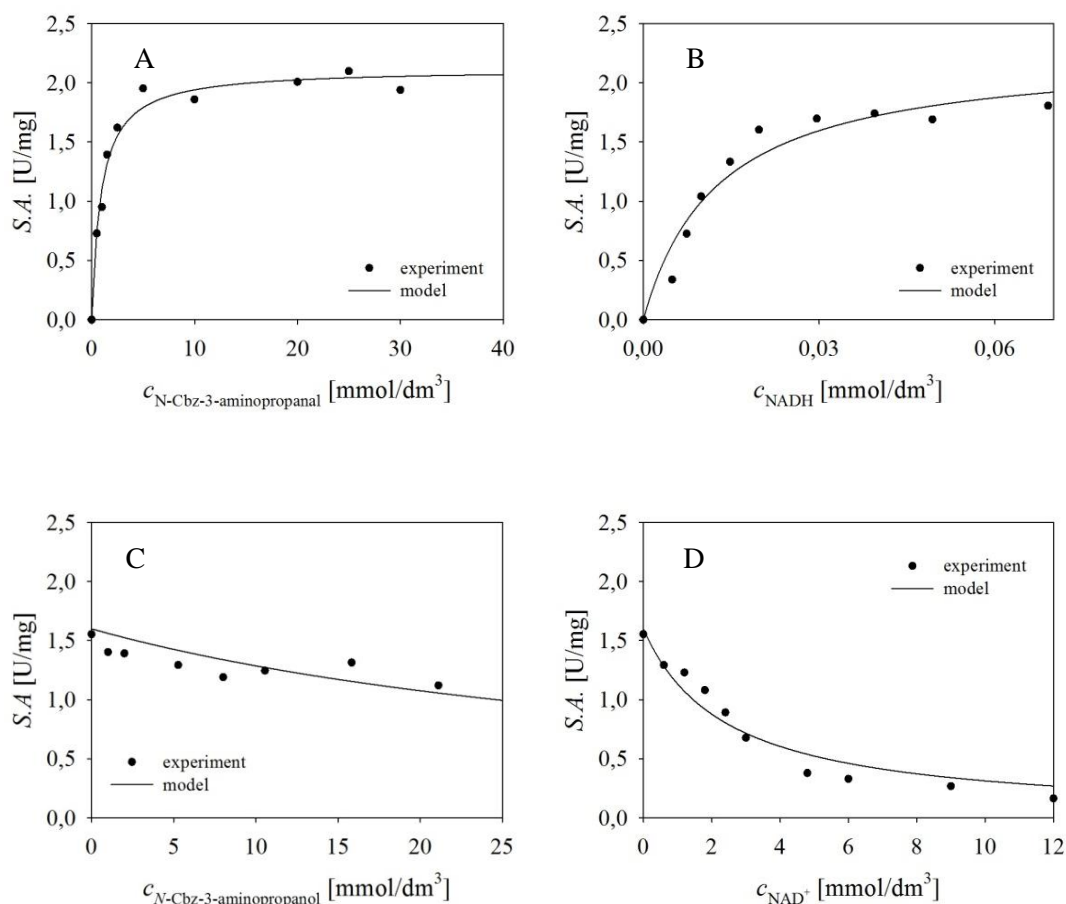
5.1.1. Kinetika oksidacije alkohola

Kako bi se odredila kinetika oksidacije Cbz-*N*-3-aminopropanola bilo je potrebno ispitati utjecaj reakcijskih komponenti na brzinu oksidacije, utjecaj koncentracije Cbz-*N*-3-aminopropanola, NAD^+ , NADH, te Cbz-*N*-3-aminopropanala na početnu brzinu reakcije oksidacije alkohola. Eksperimentalni rezultati su prikazani na slici 5.1. Slike 5.1. A i B prikazuju utjecaj koncentracije supstrata na specifičnu aktivnost alkohol dehidrogenaze u reakciji oksidacije alkohola. Iz trenda eksperimentalnih podataka se može zaključiti da se radi o Michaelis-Menteničinoj kinetici. Ovi eksperimentalni podaci su korišteni za procjenu maksimalne brzine reakcije oksidacije, V_m^{ox} , te Michaelisovih konstanti za alkohol i NAD^+ u reakciji oksidacije (K_m^{alkohol} , $K_m^{\text{NAD}^+}$). Na slici 5.1. C i D su prikazani rezultati ispitivanja utjecaja koncentracije produkata (aldehida i NADH) reakcije oksidacije na specifičnu aktivnost enzima. Kako porastom koncentracija ovih komponenti dolazi do pada aktivnosti enzima u reakciji oksidacije, može se zaključiti da oba spoja djeluju inhibicijski. Iz prikazanih eksperimentalnih podataka su procijenjene konstante inhibicije za NADH i aldehyd u reakciji oksidacije (K_i^{NADH} i K_i^{aldehyd}). Procijenjeni kinetički parametri su prikazani u tablici 5.1.



Slika 5.1. Utjecaj koncentracije A. Cbz-*N*-3-aminopropanola ($c_{NAD^+} = 0,1 \text{ mmol/dm}^3$), B. NAD^+ ($c_{Cbz-N-3-aminopropanol} = 10 \text{ mmol/dm}^3$), C. Cbz-*N*-3-aminopropanala ($c_{NAD^+} = 0,1 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{Cbz-N-3-aminopropanol} = 10 \text{ mmol/dm}^3$), D. $NADH$ ($c_{NAD^+} = 0,1 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{Cbz-N-3-aminopropanol} = 10 \text{ mmol/dm}^3$) na specifičnu aktivnost enzima u reakciji oksidacije alkohola ($V_{\text{reaktor}} = 1 \text{ mL}$, 25°C , 10% v/v acetonitril, 50 mmol/dm^3 TEA HCl pufer pH 8,0, $\gamma_{HLADH} = 0,1 \text{ mg/mL}$).

5.1.2. Kinetika redukcije aldehida



Slika 5.2. Utjecaj koncentracije A. Cbz-*N*-3-aminopropanala ($c_{\text{NADH}} = 0,05 \text{ mmol/dm}^3$), B. NADH ($c_{\text{Cbz-N-3-aminopropanal}} = 10 \text{ mmol/dm}^3$), C. Cbz-*N*-3-aminopropanola ($c_{\text{NADH}} = 0,05 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{\text{Cbz-N-3-aminopropanal}} = 10 \text{ mmol/dm}^3$) i D. NAD⁺ ($c_{\text{NADH}} = 0,05 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{\text{Cbz-N-3-aminopropanal}} = 10 \text{ mmol/dm}^3$) na specifičnu aktivnost enzima u reakciji redukcije aldehida ($V_{\text{reaktor}} = 1 \text{ mL}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 10% v/v acetonitril, 50 mmol/dm^3 TEA HCl pufer pH 8,0, $\gamma_{\text{HLADH}} = 0,1 \text{ mg/mL}$).

Kako bi se odredila kinetika redukcije aldehida, bilo je potrebno ispitati utjecaj koncentracije Cbz-*N*-3-aminopropanala, NADH, NAD⁺ te Cbz-*N*-3-aminopropanola na specifičnu aktivnost enzima u reakciji redukcije aldehida. Eksperimentalni rezultati su prikazani na slici 5.2. Slike 5.2. A i B prikazuju utjecaj koncentracije supstrata na specifičnu aktivnost alkohol dehidrogenaze u reakciji oksidacije alkohola. Iz trenda eksperimentalnih podataka se može zaključiti da se radi o Michaelis-Menteničinoj kinetici. Ovi eksperimentalni podaci su korišteni za procjenu maksimalne brzine reakcije redukcije, V_m^{red} , te Michaelisovih konstanti za aldehyd i NADH u reakciji redukcije (K_m^{aldehyd} , K_m^{NADH}). Na slici 5.2. C i D su

prikazani rezultati ispitivanja utjecaja koncentracije produkata redukcije aldehida (alkohola i NAD^+) na specifičnu aktivnost enzima. Kako porastom koncentracija ovih komponenti dolazi do pada aktivnosti enzima u reakciji oksidacije, može se zaključiti da oba spoja djeluju inhibicijski. Iz prikazanih eksperimentalnih podataka su procijenjene konstante inhibicije za NAD^+ i alkohol u reakciji redukcije ($K_i^{\text{NAD}^+}$ i K_i^{alkohol}). Procijenjeni kinetički parametri su prikazani u tablici 5.1.

Tablica 5.1. Procijenjeni kinetički parametri reakcije oksidoredukcije katalizirane s HLADH.

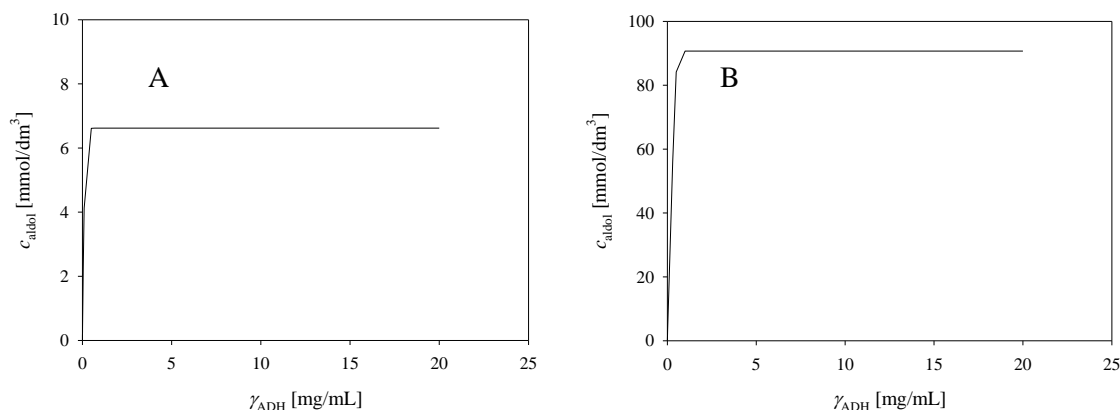
Parametar	Jedinica	Vrijednost
V_m^{red}	U/mg	2.641 ± 0.161
V_m^{ox}	U/mg	0.344 ± 0.017
K_m^{NADH}	mmol/dm ³	0.014 ± 0.003
$K_m^{\text{Cbz-N-3-aminopropanal}}$	mmol/dm ³	0.878 ± 0.161
$K_m^{\text{Cbz-N-3-aminopropanol}}$	mmol/dm ³	10.906 ± 1.925
$K_m^{\text{NAD}^+}$	mmol/dm ³	0.400 ± 0.076
$K_i^{\text{NAD}^+}$	mmol/dm ³	0.496 ± 0.057
$K_i^{\text{Cbz-N-3-aminopropanal}}$	mmol/dm ³	0.24 ± 0.002
$K_i^{\text{Cbz-N-3-aminopropanol}}$	mmol/dm ³	3.422 ± 0.705
K_i^{NADH}	mmol/dm ³	0.009 ± 0.001

Na temelju procijenjenih kinetičkih parametara prikazanih u tablici 5.1. te poznate sheme reakcije (slika 3.2.), razvijen je kinetički model oksidoredukcije opisan u prethodnom poglavlju jednažbama 4.1 i 4.2.

5.2. OPTIMIRANJE POČETNIH UVJETA REAKCIJE POMOĆU SIMULACIJA MATEMATIČKIM MODELOM KASKADNE REAKCIJE U KOTLASTOM REAKTORU

U svrhu optimiranja početnih uvjeta reakcije provedene su simulacije matematičkim modelom reakcije u kotlastom reaktoru. Simulacijama je određen utjecaj koncentracija pojedine komponente na konačnu koncentraciju aldolnog produkta. Razmatrao se utjecaj alkohol dehidrogenaze, FSA, NOX, DHA i NAD^+ pri koncentracijama alkohola od 10 mmol/dm³ i 100 mmol/dm³. Pri tome je prilikom simulacija varirana jedna varijabla, dok su ostale bile fiksirane pri uvjetima koji su navedeni ispod svake simulacije/slike.

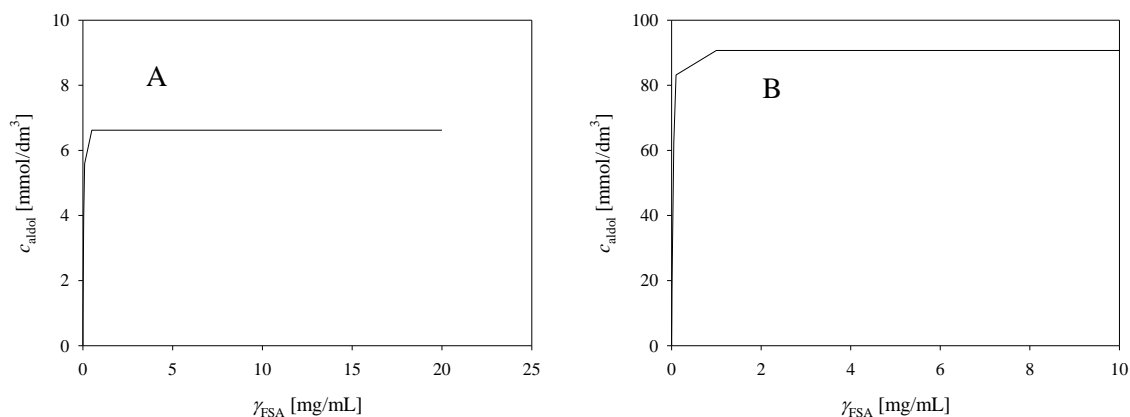
5.2.1 Utjecaj koncentracije alkohol dehidrogenaze na konačnu koncentraciju aldola



Slika 5.3. Utjecaj koncentracije alkohol dehidrogenaze na konačnu koncentraciju aldola pri A. $c_{Cbz-N-3-aminopropanol} = 10 \text{ mmol/dm}^3$ (50 mM TEA HCl pufer 8,0, 10% v/v acetonitrila, $c_{Cbz-N-3-aminopropanal} = 10 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{DHA} = 10 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{NAD^+} = 0,1 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{FSA} = 0,8 \text{ mg/mL}$, $\gamma_{NOX} = 3,25 \text{ mg/mL}$, $\gamma_{ADH} = 5 \text{ mg/mL}$, $t = 41,67 \text{ h}$) i B. $c_{Cbz-N-3-aminopropanol} = 100 \text{ mmol/dm}^3$ (50 mM TEA HCl pufer 8,0, 10% v/v acetonitrila, $c_{Cbz-N-3-aminopropanal} = 100 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{DHA} = 100 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{NAD^+} = 0,1 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{FSA} = 0,8 \text{ mg/mL}$, $\gamma_{NOX} = 3,25 \text{ mg/mL}$, $\gamma_{ADH} = 5 \text{ mg/mL}$, $t = 58,33 \text{ h}$)

Na slici 5.3. je prikazan utjecaj koncentracije alkohol dehidrogenaze na konačnu koncentraciju aldolnog produkta u reaktoru. Vidljivo je da koncentracija ADH ima pozitivan utjecaj na konačnu koncentraciju aldola u sustavu, i to pri obje koncentracije alkohola podjednako. Kada se dosegne koncentracija od oko 2 mg/mL, ona nakon toga više nema utjecaja na koncentraciju aldola u reaktoru. Maksimalna koncentracija aldola je pri tome iznosila 6,62 mmol/dm³ kada je korišten 10 mmol/dm³ alkohola nakon 25 h (slika 5.3. A). Korištenjem 100 mmol/dm³ alkohola maksimalna postignuta koncentracija aldola je iznosila 90,70 mmol/dm³ nakon 37,91 h (slika 5.3. B).

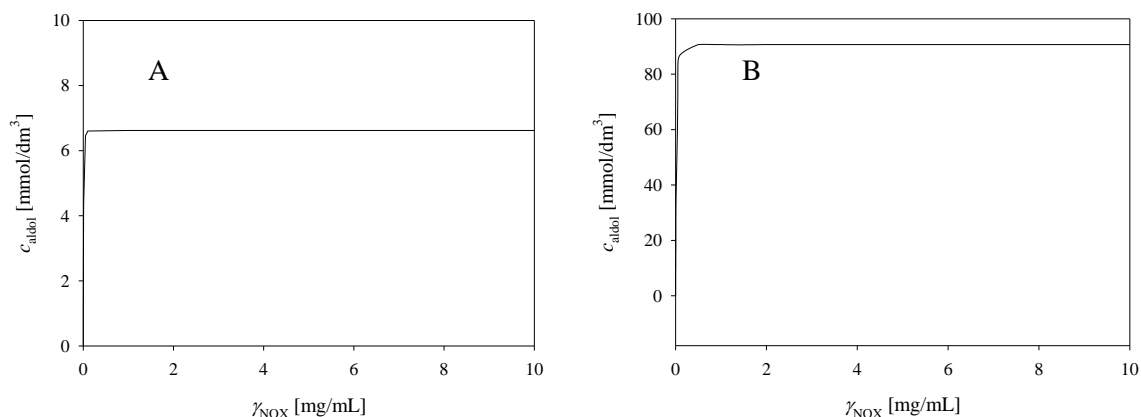
5.2.2. Utjecaj koncentracije FSA na konačnu koncentraciju aldola



Slika 5.4. Utjecaj koncentracije FSA na konačnu koncentraciju aldola pri A. $c_{Cbz-N-3-aminopropanol} = 10 \text{ mmol/dm}^3$ (50 mM TEA HCl pufer 8,0, 10% v/v acetonitrila, $c_{Cbz-N-3-aminopropanal} = 10 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{DHA} = 10 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{NAD^+} = 0,1 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{NOX} = 3,25 \text{ mg/mL}$, $\gamma_{ADH} = 5 \text{ mg/mL}$, $t = 8,33 \text{ h}$), pri B. $c_{Cbz-N-3-aminopropanol} = 100 \text{ mmol/dm}^3$ (50 mM TEA HCl pufer 8,0, 10% v/v acetonitrila, $c_{Cbz-N-3-aminopropanal} = 100 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{DHA} = 100 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{NAD^+} = 0,1 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{NOX} = 3,25 \text{ mg/mL}$, $\gamma_{ADH} = 5 \text{ mg/mL}$, $t = 11,66 \text{ h}$)

Na slici 5.4. je prikazan utjecaj koncentracije FSA na konačnu koncentraciju aldolnog produkta u reaktoru. Iz simulacije (slika 5.4. A) je vidljivo da pri 10 mM alkoholu koncentracija FSA utječe na koncentraciju aldola do koncentracije 2 mg/mL, te nakon toga više nema utjecaja na koncentraciju aldola u reaktoru. Koncentracija aldola je pri tome iznosila 6,62 mmol/dm³ nakon 8,33 h, dok je pri 100 mM alkoholu (slika 5.4. B) vidljivo da koncentracija FSA utječe na koncentraciju aldola do koncentracije 2 mg/mL, te nakon toga više nema utjecaja na koncentraciju aldola u reaktoru. Koncentracija aldola je pri tome iznosila 90,70 mmol/dm³ nakon 11,66 h.

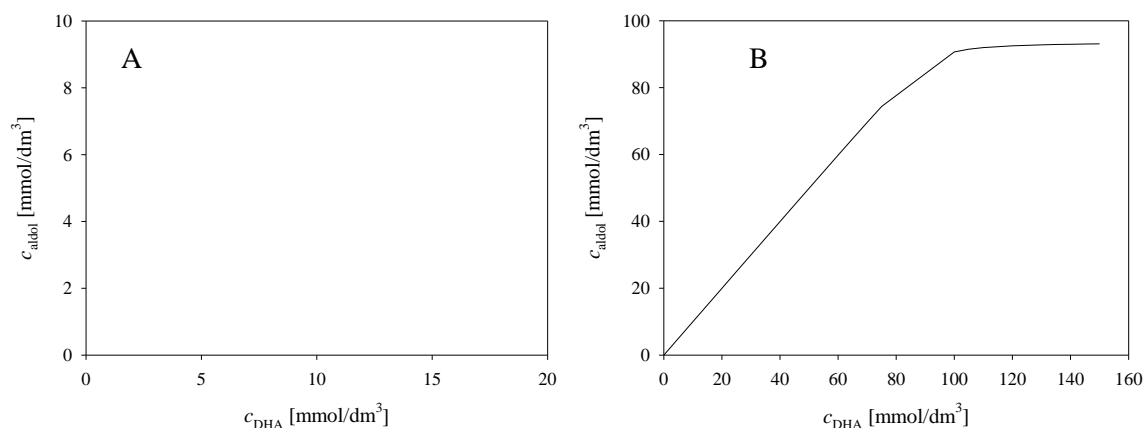
5.2.3. Utjecaj koncentracije NOX na konačnu koncentraciju aldola



Slika 5.5. Utjecaj koncentracije NOX na konačnu koncentraciju aldola pri A. $c_{Cbz-N-3-aminopropanol} = 10 \text{ mmol/dm}^3$ (50 mM TEA HCl pufer 8,0, 10% v/v acetonitrila, $c_{Cbz-N-3-aminopropanal} = 10 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{DHA} = 10 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{NAD^+} = 0,1 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{FSA} = 0,8 \text{ mg/mL}$, $\gamma_{ADH} = 5 \text{ mg/mL}$, $t = 10 \text{ h}$) i B. $c_{Cbz-N-3-aminopropanol} = 100 \text{ mmol/dm}^3$ (50 mM TEA HCl pufer 8,0, 10% v/v acetonitrila, $c_{Cbz-N-3-aminopropanal} = 100 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{DHA} = 100 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{NAD^+} = 0,1 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{FSA} = 0,8 \text{ mg/mL}$, $\gamma_{ADH} = 5 \text{ mg/mL}$, $t = 13,33 \text{ h}$)

Na slici 5.5. je prikazan utjecaj koncentracije NOX na konačnu koncentraciju aldolnog produkta u reaktoru. Vidljivo je da koncentracija NOX kod 10 mM alkohola (slika 5.5. A) utječe na koncentraciju aldola do koncentracije 1 mg/mL, a nakon toga više nema utjecaja na koncentraciju aldola u reaktoru. Koncentracija aldola je pri tome iznosila $6,62 \text{ mmol/dm}^3$ nakon 10 h. Kod simulacija s 100 mM alkoholom (slika 5.5. B) je vidljivo da koncentracija NOX utječe na koncentraciju aldola do koncentracije 1 mg/mL, pri čemu je maksimalna koncentracija aldola iznosila $90,70 \text{ mmol/dm}^3$ nakon 13,33 h.

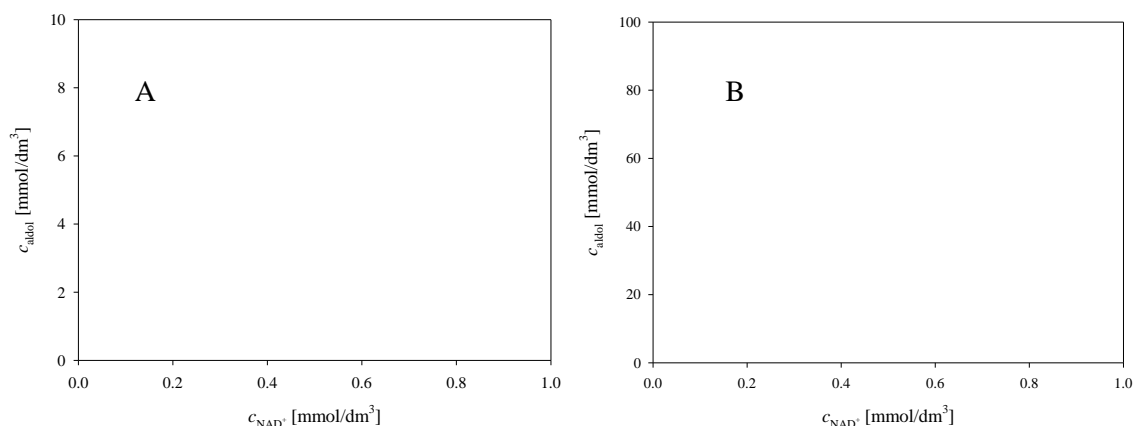
5.2.4. Utjecaj koncentracije DHA na konačnu koncentraciju aldola u reaktoru



Slika 5.6. Utjecaj koncentracije DHA na konačnu koncentraciju aldola u kotlastom reaktoru pri A. $c_{Cbz-N-3-aminopropanol} = 10 \text{ mmol/dm}^3$ (50 mM TEA HCl pufer 8,0, 10% v/v acetonitrila, $c_{Cbz-N-3-aminopropanal} = 10 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{NAD^+} = 0,1 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{FSA} = 0,8 \text{ mg/mL}$, $\gamma_{NOX} = 3,25 \text{ mg/mL}$, $\gamma_{ADH} = 5 \text{ mg/mL}$, $t = 10 \text{ h}$), pri B. $c_{Cbz-N-3-aminopropanol} = 100 \text{ mmol/dm}^3$ (50 mM TEA HCl pufer 8,0, 10% v/v acetonitrila, $c_{Cbz-N-3-aminopropanal} = 10 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{NAD^+} = 0,1 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{FSA} = 0,8 \text{ mg/mL}$, $\gamma_{NOX} = 3,25 \text{ mg/mL}$, $\gamma_{ADH} = 5 \text{ mg/mL}$, $t = 10 \text{ h}$)

Na slici 5.6. je prikazan utjecaj koncentracije DHA na konačnu koncentraciju aldolnog produkta u kotlastom reaktoru pri uvjetima simulacije navedenim ispod slike. Ispitivanjem ovisnosti koncentracije DHA na konačnu koncentraciju aldola utvrđena je ovisnost prikazana na slici, gdje se pri uporabi 10 mmol/dm^3 alkohola postiže koncentracija od $6,62 \text{ mmol/dm}^3$ aldola (slika 5.6. A), dok se pri 100 mmol/dm^3 alkohola postiže maksimalna koncentracija aldola od $90,70 \text{ mmol/dm}^3$ (slika 5.6. B). Obje konačne koncentracije aldola se pritom postižu nakon 10 h.

5.2.5. Utjecaj koncentracije NAD^+ na konačnu koncentraciju aldola



Slika 5.7. Utjecaj koncentracije NAD^+ na konačnu koncentraciju aldola pri A. $c_{\text{Cbz-}N\text{-}3\text{-aminopropanol}} = 10 \text{ mmol/dm}^3$ (50 mM TEA HCl pufer 8,0, 10% v/v acetonitrila, $c_{\text{Cbz-}N\text{-}3\text{-aminopropanal}} = 10 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{\text{DHA}} = 10 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{\text{FSA}} = 0,8 \text{ mg/mL}$, $\gamma_{\text{NOX}} = 3,25 \text{ mg/mL}$, $\gamma_{\text{ADH}} = 5 \text{ mg/mL}$, $t = 70 \text{ h}$), pri B. $c_{\text{Cbz-}N\text{-}3\text{-aminopropanol}} = 100 \text{ mmol/dm}^3$ (50 mM TEA HCl pufer 8,0, 10% v/v acetonitrila, $c_{\text{Cbz-}N\text{-}3\text{-aminopropanal}} = 100 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{\text{DHA}} = 100 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{\text{FSA}} = 0,8 \text{ mg/mL}$, $\gamma_{\text{NOX}} = 3,25 \text{ mg/mL}$, $\gamma_{\text{ADH}} = 5 \text{ mg/mL}$, $t = 111,66 \text{ h}$)

Na slici 5.7. je prikazan utjecaj koncentracije NAD^+ na konačnu koncentraciju aldolnog produkta. Vidljivo je da koncentracija NAD^+ pri 10 mmol/dm^3 alkohola utječe na koncentraciju aldola do koncentracije $0,0005 \text{ mmol/dm}^3$, a nakon toga više nema utjecaja na koncentraciju aldola u reaktoru. Koncentracija aldola je pri tome iznosila $6,62 \text{ mmol/dm}^3$ nakon 52,5 h. Korištenjem 100 mmol/dm^3 alkohola koncentracija NAD^+ utječe na koncentraciju aldola do koncentracije $0,01 \text{ mmol/dm}^3$, te nakon toga više nema utjecaja. Pri tome je koncentracija aldola iznosila $90,70 \text{ mmol/dm}^3$ nakon 67 h.

6. ZAKLJUČAK

Iz procijenjenih kinetičkih parametara za reakciju oksidoredukcije vidljivo je da je Michaelis-Menteničina konstanta za aldehid manja od konstante za alkohol, što ukazuje na visoku specifičnost enzima alkohol dehidrogenaze na aldehid kao supstrat. Iz procijenjenih konstanta inhibicije vidljivo je da su one manje za aldehid i NADH nego za NAD^+ i alkohol, što znači da one više inhibiraju reakciju. Aktivnosti alkohol dehidrogenaze je veća u reakciji oksidacije, nego za redukciju.

Na temelju iznesenih simulacija provedenih u svrhu optimiranja početnih uvjeta može se zaključiti da sve ispitane komponente (ADH, FSA, NOX, NAD^+ i DHA) imaju utjecaja na konačnu koncentraciju aldolnog produkta do neke granice. Pri uporabi 10 mM alkohola najveća moguća koncentracija aldola dobije se pri $6,62 \text{ mmol/dm}^3$, kada se koriste sljedeće koncentracije komponenata reakcijskog sustava: $\gamma_{\text{ADH}} = 2 \text{ mg/mL}$, $\gamma_{\text{FSA}} = 2 \text{ mg/mL}$, $\gamma_{\text{NOX}} = 1 \text{ mg/mL}$, $c_{\text{DHA}} = 20 \text{ mmol/dm}^3$ i $c_{\text{NAD}^+} = 0,0005 \text{ mmol/dm}^3$. Porastom navedenih koncentracija ne dolazi do nastajanja veće koncentracije produkta. Pri uporabi 100 mM alkohola najveća moguća koncentracija aldola dobije se pri $90,70 \text{ mmol/dm}^3$, kada se koriste sljedeće koncentracije: $\gamma_{\text{ADH}} = 2 \text{ mg/mL}$, $\gamma_{\text{FSA}} = 2 \text{ mg/mL}$, $\gamma_{\text{NOX}} = 1 \text{ mg/mL}$, $c_{\text{DHA}} = 100 \text{ mmol/dm}^3$ i $c_{\text{NAD}^+} = 0,01 \text{ mmol/dm}^3$. Iznad ovih koncentracija nemoguće je dobiti bilo koju veću koncentraciju konačnog aldolnog produkta.

7. LITERATURA

1. P. T. Anastas, M. M. Kirchoff; Origins, current status, and future challenges of green chemistry, *Accounts of Chemical Research*, 35(9):686-694 (2002)
2. D.Baş, I.H. Boyacı; Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology, *Journal of Food Engineering*, 78(3):836-845 (2007)
3. A. Bolt, A. Berry, A. Nelson; Directed evolution of aldolases for exploitation in synthetic organic chemistry, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 474:318-330 (2008)
4. A.L. Concia, C. Lozano, J.A. Castillo, T. Parella, J. Joglar, P. Clapés; D-fructose-6-phosphate aldolase in organic synthesis: cascade chemical-enzymatic preparation of sugar-related polyhydroxylated compounds, *Chemistry—A European Journal*, 15:3808-3816 (2009)
5. D.W. Crabb, M. Matsumoto, D. Changa, M.You; Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology, *The Proceedings of the Nutrition Society*, 63(1):49-63 (2004)
6. H.J. Edenberg; The genetics of alcohol metabolism: Role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase variants, *Alcohol Research & Health*, 30(1):5-13(2007)
7. H.Eklund, B. Nordström, E. Zeppezauer, G. Söderlund, I. Ohlsson, T. Boiwe, C.I. Brändén; The Structure of horse liver alcohol dehydrogenase, *FEBS Letters*, 44(2):200-204 (1974)
8. X. Garrabou, J.A. Castillo, C. Guérard-Hélaine, T. Parella, J. Joglar, M. Lemaire, P. Clapés; Asymmetric self- and cross- aldol reactions of glycolaldehyde catalyzed by D-fructose-6-phosphate aldolase, *Angewandte Chemie International Edition*, 48:5521-5525 (2009)
9. B. Geueke, W. Hummel; A new bacterial L-aminoacid oxidase with a broad substrate specificity: purification and characterization, *Enzyme and Microbial Technology*, 31:77-87 (2002)
10. C. Grondal, M. Jeanty, D. Enders; Organocatalytic cascade reactions as a new tool in total synthesis; *Nature Chemistry*, 2:167-178 (2010)

11. G.T.M. Hennehan, N.J. Oppenheimer; Horse liver alcohol dehydrogenase-catalyzed oxidation of aldehydes: dismutation precedes net production of reduced nicotinamide adenine dinucleotide, *Biochemistry* 32, 3:735-738 (1993)
12. K. Hernandez, I. Zelen, G. Petrillo, I. Usón, C.M. Wandtke, J. Bujons, J. Joglar, T. Parella, P. Clapés; Engineered L-serine hydroxymethyltransferase from *Streptococcus thermophilus* for the synthesis of α , α – dialkyl - α – amino acids, 54(10):3013-3017 (2015)
13. T. Johannes, M.R. Simurdiak, H. Zhao; Biocatalysis, *Encyclopedia of Chemical Processing*, Taylor & Francis, New York, 2006, str. 101-109
14. E.F. Murphy, S.G. Gilmour, M.J. Crabbe; Effective experimental design: enzyme kinetics in the bioinformatics era, *Drug Discovery Today*, 7(20):187-191 (2002)
15. G. Narahari Sastry; Organic chemists conquer the synthesis of C₆₀, *Current Science*, 85(2):125-126(2003)
16. K.C. Nicolaou, J.S. Chen; The art of total synthesis through cascade reactions, *Chemical Society Reviews*, 38, 11:2969-3276 (2009)
17. K.C. Nicolaou, D.J. Edmonds, P.G. Bulger; Cascade reactions in total synthesis, *Angewandte Chemie International Edition*, 45:7134-7186 (2006)
18. S. Ramaswamy, H. Eklund, B.V. Plapp; Structures of horse liver alcohol dehydrogenase complexed with NAD⁺ and substituted benzyl alcohols, *Biochemistry*, 33(17):5230-5237 (1994)
19. M.F. Reid, C.A. Fewson; Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases, *Critical Reviews in Microbiology*, 20(1):13-56 (1994)
20. W.Saibi, S. Abdeljalil, K. Masmoudi, A. Gargouri; Biocatalysts: Beautiful creatures, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 426(3):289-93 (2012)
21. L.T. Scott, M.M. Boorum, B. J. McMahon, S. Hagen, J. Mack, J. Blank, H. Wegner, A. de Meijere; A rational chemical synthesis of C₆₀, *Science.*, 295(5559):1500-1503 (2002)
22. M. Sudar, Z. Findrik, Đ. Vasić-Rački, P. Clapés, C. Lozano; Mathematical model for aldol addition catalyzed by two D-fructose-6-phosphate aldolases variants overexpressed in *E. coli*, *Journal of Biotechnology*, 167:191-200 (2013)
23. M. Sudar, Z. Findrik, Đ. Vasić-Rački, A. Soler, Pere Clapés; A new concept for production of (3*S*,4*R*)-6-[(benzyloxycarbonyl)amino]-5,6-dideoxyhex-2-ulose, a precursor of D-fagomine, *RSC Advances*, 5:69819-69828 (2015)

24. M. Sudar, Z. Findrik, M. Vuković Domanovac, Đ. Vasić-Rački; Coenzyme regeneration catalyzed by NADH oxidase from *Lactococcus lactis*, Biochemical Engineering Journal, 88:12-18 (2014)
25. H. Suzuki; How enzymes work: from structure to function, Taylor & Francis, Boca Raton, 2015, str. 1-2, 24, 35-40, 43-46
26. A. Trincone; Potential biocatalysts originating from sea environments, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 66:241-243(2010)
27. K. Van't Riet, J. Tramper; Basic Bioreactor Design, Marcel Dekker, New York, 1991, str. 91-94
28. M. Wang, T. Si, H. Zhao; Biocatalyst development by directed evolution; Bioresource Technology, 115:117-125 (2012)
29. A. Weckbecker, H. Gröger, W. Hummel; Regeneration of nicotinamide coenzymes: principles and applications for the synthesis of chiral compounds, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 120:195-242 (2010)
30. A. Zaks; Industrial biocatalysis, Current opinion in chemical biology, 5:130-136 (2001)

PRILOG

Prilog 1. Program u SCIENTIST-u za simulaciju kaskadne reakcije

//MicroMath Scientist Model File

IndVars: t

DepVars: c1,c2,c3,c4,c5,c6

Params: Vmox,Vmred,Km1,Km2,Km3,Km4,Ki1,Ki2,Ki3,Kma,Km5,Km6,Ki4,Kmn,Kin,g

$r1 = (Vmox * c1 * c2 * gADH) / ((Km1 + c1) * (c2 + Km3 * (1 + (c4/Ki3))))$

$r2 = (Vmred * c3 * c4 * gADH) / ((c3 + Km2 * (1 + (c1/Ki1))) * (c4 + Km4 * (1 + (c2/Ki2))))$

$r3 = (Vm1 * c3 * c5 * g) / ((Kma + c3) * (Km5 + c5))$

$r4 = (Vm2 * c6 * g) / (c6 + Km6 * (1 + c3/Ki4))$

$r5 = (Vm3 * c4 * gNOX) / (Kmn + c4 * (1 + c4/Kin))$

$c1' = -r1 + r2$

$c2' = -r1 + r2 + r5$

$c3' = r1 - r2 - r3 + r4$

$c4' = r1 - r2 - r5$

$c5' = -r3 + r4$

$c6' = r3 - r4$

t=0

c1=10

c2=0.1

c3=0

c4=0

c5=10

c6=0

gADH=5

gNOX=3.25

Vmox=0.344

Vmred=2.641

Km1=10.906

Km2=0.878

Km3=0.400

Km4=0.014

Ki1=3.422

Ki2=0.496

Ki3=0.009

Vm1=10.20

Vm2=203.03

Kma=167.34

Km5=11.01

Km6=1878.09

Ki4=0.24

g=0.8

Vm3=16.409

Kmn=0.005

Kin=0.149

POPIS SIMBOLA

HLADH – enzim alkohol dehidrogenaza iz jetre konja vrste *Equus Caballus*

DHA – dihidroksiaceton

FSA – D-fruktoza-6-fosfat

NOX – NADH oksidaza

r_s – brzina reakcije, mmol/dm³min

V_m – maksimalna brzina reakcije, mmol/dm³min

c_s – koncentracija supstrata, mmol/dm³

K_m^S - Michaelis-Mentiničina konstanta, mmol/dm³

k_3 – katalitička konstanta enzima, min⁻¹

c_{E0} – početna koncentracija enzima, mmol/dm³

K_i – konstanta inhibicije, mmol/dm³

γ_{FSA} – masena koncentracija FSA, mg/mL

γ_{NOX} – masena koncentracija NOX, mg/mL

γ_{ADH} – masena koncentracija alkohol dehidrogenaze (ADH), mg/mL

t – vrijeme, h

ŽIVOTOPIS

Mia Došen rođena je 4.11.1993. u Zagrebu. Završila je OŠ Horvati u Zagrebu. Nakon završene osnovne škole upisala je Gornjogradsku gimnaziju, maturirala 2012. godine, te iste upisala Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, studij Ekoinženjerstvo.